10 月 October
2019, 62(10): 1162 - 1171
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.10.005

意大利蜜蜂染色体 DNA 非编码区抗白垩病相关的 SNP 的筛选与验证

聂红毅, 许叔鹏, 王雪妍, 高 艳, 朱雅楠, 苏松坤*

(福建农林大学蜂学学院, 福州 350000)

摘要:【目的】筛选验证意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 染色体 DNA 非编码区与抗白垩病相关的 SNP。【方法】本研究将蜜蜂球囊菌 *Ascosphaera apis* 孢子接种于人工饲养的意大利蜜蜂 3 日龄幼虫,根据是否存在白垩病症状进而筛选出抗病个体和易感个体。基于前期重测序结果中意大利蜜蜂第 2 和 11 号染色体 DNA 非编区与抗白垩病相关的 SNP 信息,利用 PCR 测序的方法筛选并验证意大利蜜蜂幼虫第 2 和 11 号染色体 DNA 非编码区与幼虫抗白垩病相关的 55 个 SNP。【结果】发现位于意大利蜜蜂第 11 号染色体 *LOC*100578413 基因 5′端的非编码区的 SNP(T14570310C)在抗病个体中 T 等位基因频率高于 C 等位基因频率,且抗病个体中的 T 等位基因频率显著高于易感幼虫中的 T 等位基因频率,表明该 SNP 位点与抗白垩病相关。该分子标记对抗性个体和易感个体的判断结果与前期筛选的编码区 SNP(C2587245T)分子标记的结果一致。【结论】筛选并验证意大利蜜蜂第 11 号染色体 DNA 非编码区的 SNP(T14570310C)与抗白垩病相关。该位点为抗白垩病分子辅助选育提供新的分子标记,在意大利蜜蜂白垩病早期检测和培育白垩病抗性的蜂种方面具有重要意义。

关键词: 意大利蜜蜂; 白垩病; 染色体 DNA; 非编码区; SNP; 抗病个体

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)10-1162-10

Screening and validation of SNPs associated with chalkbrood resistance in non-coding regions of DNA of chromosomes of *Apis mellifera ligustica*

NIE Hong-Yi, XU Shu-Peng, WANG Xue-Yan, GAO Yan, ZHU Ya-Nan, SU Song-Kun* (College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, China)

Abstract:【Aim】This study aims to screen and verify the SNPs associated with chalkbrood resistance in the non-coding regions of DNA of chromosomes of *Apis mellifera ligustica*.【Methods】*Ascosphaera apis* spores were inoculated to the artificially reared 3-day-old larvae of *A. m. ligustica*, and the disease-resistant individuals and susceptible larvae were screened based on whether they displayed typical symptoms. According to the SNP information associated with chalkbrood resistance in the non-coding regions of DNA of chromosomes 2 and 11 from our previous resequencing results, 55 SNPs associated with chalkbrood resistance located in the non-coding regions of DNA of chromosomes 2 and 11 of *A. m. ligustica* larva were screened and validated by sequencing of PCR products.【Results】The results revealed that the SNP T14570310C located in the 5′ non-coding region of the *LOC*100578413 gene on chromosome 11 of *A. m. ligustica* showed a higher T allele frequency than the C allele frequency in the

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(蜜蜂)项目(CARS-44-KXJ4); 福建省自然科学基金项目(2018J05043); 福建省省属高校科研项目(JK2017014)

作者简介: 聂红毅, 男, 1983 年 7 月生, 河南三门峡人, 博士研究生, 讲师, 研究方向为蜜蜂抗病育种及分子生物学, E-mail: hnhynie@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: susongkun@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-05-08; 接受日期 Accepted: 2019-07-09

disease-resistant individuals and a significantly higher T allele frequency in the disease-resistant individuals than in the susceptible larvae, suggesting that this SNP is associated with the resistance to chalkbrood disease. This molecular marker was consistent with the SNP C2587245T located in the coding region screened previously in respect of the distinction between the disease-resistant and susceptible individuals. 【Conclusion】The SNP T14570310C in the non-coding region of DNA of chromosome 11 of *A. m. ligustica* was screened and verified to be associated with the resistance to chalkbrood disease. This SNP provides a new molecular marker for molecular-assisted breeding against chalkbrood disease, and has important significance in early detection of chalkbrood infection and breeding bees resistant to chalkbrood disease.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; chalkbrood disease; chromosomal DNA; non-coding region; SNP; disease-resistant individuals

蜜蜂白垩病是由蜜蜂球囊菌 *Ascosphaera apis* 感染蜜蜂幼虫所引起的一种真菌性疾病，最早在意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 中发现（Aronstein and Murray, 2010），且对意大利蜜蜂蜂群群势和生产性能影响较大（Reynaldi *et al*., 2015）。近几年，在中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*（Chen *et al*., 2018）、木蜂 *Xylocopa californica arizonensis* 和熊蜂 *Bombus griseocollis* 中也有检测到白垩病（Maxfield-Taylor *et al*., 2015）。蜜蜂球囊菌是异宗配合的子囊菌（Heath, 1982），异性菌丝通过相互接触产生孢子（Anderson and Gibson, 1998; Pöggeler, 2001）。球囊菌孢子为长椭圆形（Li *et al*., 2018），通过幼虫进食进入到肠道中，在围食膜中萌发（Theantana and Chantawannakul, 2008），之后菌丝从体腔内部穿出肠壁，尾部长出白色菌丝（郑志阳等, 2011; 李江红等, 2012），死亡后继续脱水干燥形成白垩状干尸（Spiltoir, 1955）。由于白垩病发病早期没有明显症状，一旦发现已进入晚期（Flores *et al*., 2005a），且孢子存活时间可以达到 15 年（Flores *et al*., 2005b）。虽然蜜蜂的卫生行为可以将发病或死亡蜜蜂拖出巢外，但如果孢子已经形成，蜜蜂的卫生行为反而会促使孢子传播，进而加剧白垩病病情（Invernizzi *et al*., 2011）。白垩病的暴发严重危害蜂群群势，对养蜂人造成巨大的损失（赵红霞等, 2014）。

随着蜜蜂球囊菌基因组测序完成（Qin *et al*., 2006），展开了对蜜蜂球囊菌非编码 RNA（non-coding RNA, ncRNA）的研究，鉴定了 379 个长链非编码 RNA（long non-coding RNA, lncRNA）和 118 个微小 RNA（microRNA, miRNA），不仅扩大了真菌的 lncRNA 数据库，而且为进一步研究潜在的 lncRNA 介导的蜜蜂球囊菌基因调控奠定了基础（Guo *et al*., 2018）。通过转录组测序技术来分析蜜蜂对球囊菌免疫应答的基因和通路，揭示了发育、能量代谢、信号转导、疾病与免疫应答相关联，为研究蜜蜂对白垩病免疫应答的分子机制提供了有价值的基因转录信息（Xu *et al*., 2019）。

单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP）由于其数量多、分布广、易于自动化分析等优势，被认为是目前应用前景最好的遗传标记（Invernizzi *et al*., 2011）。Holloway 等（2013）对不同抗白垩病能力个体的 SNP 位点与抗病性状之间的关系进行了研究，鉴定出蜜蜂幼虫第 2 和 11 号染色体与蜜蜂幼虫抗白垩病性状显著相关，为分子辅助选育提供了基础。本团队晏励民等（2014）基于重测序技术筛选出抗白垩病蜜蜂幼虫特有 SNP 位点为 1 620 个，其中位于编码区与蜜蜂抗白垩病相关的 SNP 位点 680 个（118 个位于第 11 号染色体上，52 个位于第 2 号染色体上）。刘元珍等在前期研究的基础上通过实验室培养蜜蜂幼虫筛选抗病幼虫个体和易感病幼虫个体筛选验证出一个可以评估蜂群抗白垩病能力的 SNP 分子标记 C2587245T，该标记位于 *MRJP5* 基因第 2 个内含子区域内，其在抗白垩病蜂群中 C 等位基因频率（P_C）显著大于易感病蜂群中的频率，且 C2587245T 位点 P_C 高的蜂群白垩病发病率较低。因此，C2587245T 可以作为一个分子标记选育抗白垩病的蜂群或蜂王（Liu *et al*., 2016）。

除了编码区序列 SNP 位点对生物性状表现具有重要的作用外，生物基因组 DNA 非编码区也存在与疾病相关的 SNP 位点。非编码 DNA 可以转录出非编码 RNA，ncRNA 可通过自身转录、DNA 甲基化、组蛋白修饰、重塑染色质等途径调控基因表达，影响多种生物学过程（秦丹和徐存拴, 2013）。鉴于 DNA 非编码区的生物学意义，本研究在前期已有的基础上，筛选并验证意大利蜜蜂幼虫第 2 和 11 号染

色体 DNA 非编码区上与白垩病抗病相关的 SNP 位点,为白垩病的诊断提供更多的分子标记,加速分子辅助筛选和培育抗白垩病蜂种进程,具有重要的实践应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验蜂群与样本采集

本实验采用的 5 个实验蜂群均为 2017 年来自福建福清蜂场的"蜂强 1 号"意大利蜜蜂,该蜂种是采用蜜蜂闭锁群体育种(closed-population breeding)方法,以蜂王浆优质高产抗白垩病为目标,从浙江杭州、长兴、平湖、萧山、慈溪、桐庐、兰溪、龙游、江山、新昌和德清 11 个不同血统的蜂场,选择蜂王浆产量高、没有白垩病发病史的蜂群作为育种素材,分别培育雄蜂和处女王,采用自然隔离交尾和蜜蜂人工授精技术,后期结合分子辅助选育技术,注重抗白垩病经济性状和蜂王浆优质高产性状的选育,兼顾蜂群繁殖速度和蜂蜜产量性状的考察选育,经过多代的培育,形成遗传相对稳定、抗白垩病能力强、群势强、蜂王浆优质高产的蜂种。实验蜂群饲养于福建农林大学蜂学学院,蜂群群势保持一致。为了获得相同日龄的幼虫,将 5 群实验蜂群的蜂王进行限王产卵,然后从每个蜂群分别取 192 头 2 日龄幼虫转移到 4 个 48 孔细胞培养板中(预先加入 10 μL 幼虫食物)共计 20 板。移虫过程中,每移取 10 头幼虫用 70% 的酒精消毒移虫针,防止病原交叉传染。幼虫食物的配方、饲喂量与培养方法参考前人报道(Crailsheim *et al*., 2013)。3 日龄幼虫饲喂蜜蜂球囊菌孢子,孢子根据 Vojvodic 等(2011)的方法培养和纯化蜜蜂球囊菌获得,每头幼虫饲喂 10 μL 含有蜜蜂球囊菌孢子浓度为 5×10^4 个/μL 的食物(Jensen *et al*., 2013)。每天在固定时间饲喂幼虫,从 6 日龄开始收集白垩病发病个体(发病死亡特征:虫体不蠕动、身体无弹性、无光泽、尾部有白色菌丝)作为易感病样本;幼虫到达 10 日龄时,将化蛹的未死亡的个体收集起来作为抗病样本。易感样本和抗病样本置于 -80℃ 冰箱保存。

1.2 主要仪器与试剂

梯度 PCR 仪(Applied Biosystems)、NanoDrop 2000(基因有限公司)、低温高速离心机(Eppendorf)、全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司)、核酸提取仪 KINGFISHER FLEX(Thermo Scientific)等。

蜂王浆(购自杭州余杭蜂场,通过低温冷冻运输,且储存于 -80℃ 冰箱中);葡萄糖(D-glucose)、果糖(D-fructose)、酵母提取物、氯化钠、硫酸钾、蛋白胨、琼脂等(生工生物工程股份有限公司);2 × EasyTaq PCR SuperMix(北京全式金生物科技有限公司);LabServ Cell & Tissue DNA Kit(Thermo Scientific)等。

1.3 引物设计

根据晏励民(2014)的蜜蜂全基因组重测序结果筛选得到了关于蜜蜂幼虫 DNA 非编码区与抗白垩病相关的 SNP 信息,其中位于第 2 和 11 号染色体 DNA 非编码区的候选 SNP 分别为 24 个和 31 个(表 1)。从 NCBI 数据库中搜索并下载这些位点前后各 500 bp 的序列,利用 Primer Premier 6 设计特异性引物,PCR 产物片段大小约为 400 bp,包含 SNP 位点,且正反向引物 Tm 值接近。

1.4 基因组 DNA 提取

利用核酸提取仪 KINGFISHER FLEX,并按照 LabServ Cell & Tissue DNA Kit 的操作步骤提取 1.1 节意大利蜜蜂幼虫各处理样品的 DNA。主要步骤如下:用灭菌后的眼科手术剪剪取 10 mg 实验样本(抗病与易感病样本分开操作,且每剪 1 头后,用 70% 的酒精对剪刀进行擦洗),置于 1.5 mL 离心管中,加入 100 μL Lysis Buffer 和 5 μL 蛋白酶 K 涡旋混匀;55℃水浴 2 h,期间颠倒混匀若干次以提高裂解效果,然后室温静置 10 min;按照核酸提取仪的操作说明运行 DNA 程序;提取 DNA 的浓度和纯度利用 NanoDrop 2000 检测。

1.5 PCR 扩增和测序

PCR 扩增体系(20 μL):2 × EasyTaq® PCR SuperMix 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL,1.4 节提取的基因组 DNA 2 μL,加 ddH_2O 至 20 μL。PCR 扩增条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环数为 35;72℃再延伸 10 min,4℃保存 1 h。PCR 产物由铂尚生物技术(上海)有限公司进行测序。

1.6 SNP 位点初步验证与扩大群体验证

随机选取意大利蜜蜂抗病个体和易感个体各 12 头,分别提取其 DNA 用于初步验证前期本团队重测序获得的 55 个(2 号染色体上 24 个,11 号染色体上 31 个)与抗白垩病相关的 DNA 非编码区 SNP 位点。以每个个体 DNA 为模板,利用包含 SNP 位点的引物(表 1)分别进行 PCR(同 1.5 节),并将 PCR 产物进行测序,最后计算每个 SNP 位点等位基因的频率。我们将初步验证中抗病个体与易感个体

等位基因频率分布无差异显著性的 SNP 位点淘汰，而将等位基因频率分布存在差异显著性的 SNP 位点进一步扩大群体验证。在扩大群体验证中，我们再随机选取意大利蜜蜂抗病个体和易感个体各 90 头，分别提取其 DNA 用于 PCR 产物测序，计算每个 SNP 位点的等位基因频率，并验证这些 SNP 位点的等位基因频率趋势是否与初步验证的结果一致。同时，我们在抗病个体和易感个体中也检测前期已报道的编码区与抗白垩病相关的 SNP(C2587245T)等位基因频率，验证 P_C 在抗性个体中的频率是否显著高于其在易感个体中的频率。

1.7　生物信息学分析

在 NCBI(https：//www. ncbi. nlm. nih. gov/)核酸数据库在线检索 SNP 对应的 NW 编号(表 1)，根据 NW 序列与染色体序列的对应关系，确定该 SNP 在基因组上对应的染色体编号及位置；NCBI 在线检索染色体的编号，根据 SNP 在染色体序列上的位置定位到该 SNP 并得到该 SNP 附近的基因信息。

1.8　数据分析

在 NCBI 意大利蜜蜂基因组数据库中，下载每个 SNP 位点附近的一段序列作为参考序列，并利用 Lasergene (SeqMan)软件将测序结果与参考序列进行校对分析，排除假阳性的 SNP 位点，记录下 SNP 在每个样本的基因型(纯合或者杂合)，统计在抗病与易感病个体中各基因型的数量，计算基因频率。将相关数据导入 IBM SPSS Statistics 21 统计分析软件，利用卡方检验进行差异显著性分析。

表 1　意大利蜜蜂幼虫第 2 和 11 号染色体 DNA 非编码区与抗白垩病相关的候选 SNP 及其引物序列

Table 1　SNPs associated with chalkbrood resistance in non-coding regions of DNA of chromosomes 2 and 11 of *Apis mellifera ligustica* larva and sequences of their primers

序号 No.	SNP 所在染色体骨架(染色体) Location of the SNP on the scaffold (Chromosome)	SNP 在基因组上的位置 Position of SNPs in the genome	SNP 在基因组上的序列 Sequence of SNPs in the genome	引物序列(5′-3′) Primer sequences
1	NW_003378123.1 (Chr. 2)	3 447 130	A	F：GCCGTCGCTTCTACTCTCTC R：AGCACGACATTCCGTTGGAT
2	NW_003378123.1 (Chr. 2)	1 916 903	C	F：CCGCTATCTTTGTCGCCTCT R：GGAATGTCTCCCCGTTCGTT
3	NW_003378123.1 (Chr. 2)	1 326 498	A	F：CGACTGGTTAAGACTACACA R：CTAACTCCTAACACGAGAAGA
4	NW_003378123.1 (Chr. 2)	11 528	G	F：GACCAACCATTGCTTCTTC R：GCTTGACCGTCCATAATCT
5	NW_003378111.1 (Chr. 2)	1 108 857	T	F：CCTTGATTCGTAATGAGACTC R：CTAATTGCGTTCGTGACAT
6	NW_003378082.1 (Chr. 2)	605 442	C	F：GACACAGAAGACCATTGAAC R：GATCGGTCGTGCAAGAAT
7	NW_003378082.1 (Chr. 2)	605 427	T	F：GACACAGAAGACCATTGAAC R：GATCGGTCGTGCAAGAAT
8	NW_003378082.1 (Chr. 2)	602 578	A	F：GAAAGAAAGACAGAAGAGAAGG R：CTATCCTGACCTATCGTTACC
9	NW_003378082.1 (Chr. 2)	265 918	A	F：GATGATGACTTCGTGTGAAT R：ATTAACCGTCTGCCGATG
10	NW_003378082.1 (Chr. 2)	233 106	A	F：TTTACGAGGCGGGGAAACAA R：TACTGGAACAGGGGGATGGT
11	NW_003378082.1 (Chr. 2)	92 706	G	F：GCGGTGGTGTGATCTCTTGA R：GATAAACGGACGGGGAGGTG
12	NW_003378058.1 (Chr. 2)	696 915	G	F：TCTACTACGAATCACGGATG R：GGAAGGTTGAAGGTAAGGAA
13	NW_003378058.1 (Chr. 2)	144 846	T	F：GTAGATGTTGGCCGGAACGA R：TCTTCGGGAGAAACGAACGG
14	NW_003378058.1 (Chr. 2)	116 986	T	F：ACGCAATCCCTGTTCACCTC R：GTAGCTCCTCACCGCAAAGT

续表 1 Table 1 continued

序号 No.	SNP 所在染色体骨架(染色体) Location of the SNP on the scaffold (Chromosome)	SNP 在基因组上的位置 Position of SNPs in the genome	SNP 在基因组上的序列 Sequence of SNPs in the genome	引物序列(5′-3′) Primer sequences
15	NW_003378040.1 (Chr. 2)	569 303	T	F: AACAACGTCCGCCACTACTT R: GCGGCAAGCAATAATACCCC
16	NW_003377991.1 (Chr. 2)	1 363 256	T	F: CCACGCAATCCTCTAACA R: GCTTCGATCAAGGTCAGT
17	NW_003377991.1 (chr. 2)	1 293 878	A	F: GGCTGGACCGCATAATCCAT R: TGAGGAAGCCGTGCAAGAAA
18	NW_003377991.1 (Chr. 2)	487 139	A	F: AACTTCTTCGAGCGAGTATA R: ACAATGTGATTCCAATCTGG
19	NW_003377991.1 (Chr. 2)	3 844	C	F: CGCTTATTCGTGGACAGA R: GTCGATGGTCATGGATAGAT
20	NW_003377991.1 (Chr. 2)	3 791	A	F: CGCTTATTCGTGGACAGA R: GTCGATGGTCATGGATAGAT
21	NW_003377976.1 (Chr. 2)	403 466	A	F: AGCGTTATCAGCCTCGTGTG R: CAAGGGAATGCGCTCTGTTT
22	NW_003377965.1 (Chr. 2)	109 593	T	F: TCGATCTTTGATCGTGCAA R: TTCAGAGATCAGTGTGGAAT
23	NW_003377911.1 (Chr. 2)	6 538	A	F: TTGTCACTGTTGCTCGTT R: CAATCTCAGTGGAAGAATGG
24	NW_003377911.1 (Chr. 2)	6 462	C	F: TTGTCACTGTTGCTCGTT R: CAATCTCAGTGGAAGAATGG
25	NW_003378155.1 (Chr. 11)	980 174	A	F: GGTTATATCATTGTGGTCACTC R: CCCGATCCTTTCATTCTTATTC
26	NW_003378155.1 (Chr. 11)	980 137	C	F: GGTTATATCATTGTGGTCACTC R: CCCGATCCTTTCATTCTTATTC
27	NW_003378155.1 (Chr. 11)	980 111	T	F: GGTTATATCATTGTGGTCACTC R: CCCGATCCTTTCATTCTTATTC
28	NW_003378155.1 (Chr. 11)	980 101	T	F: GGTTATATCATTGTGGTCACTC R: CCCGATCCTTTCATTCTTATTC
29	NW_003378155.1 (Chr. 11)	160 793	T	F: CTACATTCGTGGCACTTATAC R: GCGTTTAGATCGTCTTGAAA
30	NW_003378155.1 (Chr. 11)	156 247	C	F: CAATCGCTATCTAACTTATCGG R: GGTTCAAGAAGCAAGTAGGA
31	NW_003378088.1 (Chr. 11)	4 009 533	A	F: ACGATTCTGATTGTTGGTTC R: GCTCGGTTATTCAGTTGTC
32	NW_003378088.1 (Chr. 11)	3 928 681	C	F: CCGCCAAGATGTAACAATC R: TTACGAGGACGGCAGATA
33	NW_003378088.1 (Chr. 11)	3 156 753	T	F: TTTCTTCTGGGATTCTGTGA R: CTTCCTTTCTTAGCTACCATC
34	NW_003378088.1 (Chr. 11)	3 117 278	C	F: CGACGAGATAAGGAATACAC R: GCGACGAGTTTCATCCAA
35	NW_003378088.1 (Chr. 11)	3 068 820	A	F: TCACCTCTCCACTGGATC R: CGAACAAGGGAAATCTTACG
36	NW_003378088.1 (Chr. 11)	2 920 845	T	F: GTCTTGCGTACACAGGAA R: ACGAACAGCATAACCTTCA
37	NW_003378088.1 (Chr. 11)	2 597 336	T	F: AACACGTAGCAAGCAGTC R: CCGAGCAAGTTCTTACGA

续表 1 Table 1 continued

序号 No.	SNP 所在染色体骨架(染色体) Location of the SNP on the scaffold (Chromosome)	SNP 在基因组上的位置 Position of SNPs in the genome	SNP 在基因组上的序列 Sequence of SNPs in the genome	引物序列(5′-3′) Primer sequences
38	NW_003378088.1 (Chr. 11)	2 594 038	C	F：TCGAACAATCGTGTCCGTTTC R：ATTCGATGTTGCGAGGGGAA
39	NW_003378088.1 (Chr. 11)	2 226 899	A	F：CAACTCTCAACAACTTCAAC R：GGAGATTAGGAGCAGGAG
40	NW_003378088.1 (Chr. 11)	1 880 352	A	F：CGACGCTTGGAATTAAGTT R：GTTGTTGTTCGCAGTATAGA
41	NW_003378088.1 (Chr. 11)	1 440 682	T	F：CCATGTAGAGCAGAGTGTT R：GGTGATTCTCCGCAGTTA
42	NW_003378088.1 (Chr. 11)	1 230 068	G	F：CTTCTTCTTCGTTTGTTGGT R：TGTTCGGCTGTTAGTGTT
43	NW_003378088.1 (Chr. 11)	311 157	T	F：CTCGTCTCACTGACCTATAC R：TTCAATACCGTCGCTAGATT
44	NW_003378054.1 (Chr. 11)	1 284 280	C	F：CCCCACACTATGCCACGTAA R：CACGACTCTCTCTGTCTGCC
45	NW_003378054.1 (Chr. 11)	1 060 121	T	F：CGACCATAACCTATGACAATAG R：GCGACTAAGTAAGAGCTGTAT
46	NW_003378043.1 (Chr. 11)	613 167	G	F：AGTGAGACAAGGATAACGAGAGTG R：TCACGTGTCGAAAGCATGTG
47	NW_003377985.1 (Chr. 11)	13 310	A	F：AAGATTCCGGTACTGTGCGA R：GGACATTGCCTTGGGGACTT
48	NW_003377973.1 (Chr. 11)	425 874	A	F：CCAAGCATGACAGAGATGA R：GCAAACATAAGTGGAGGATAC
49	NW_003377973.1 (Chr. 11)	425 835	G	F：CCAAGCATGACAGAGATGA R：GCAAACATAAGTGGAGGATAC
50	NW_003377973.1 (Chr. 11)	420 935	A	F：CGCACGTTCCTTTCGGTTTT R：GAATTGCTAGGCAACACGGC
51	NW_003377973.1 (Chr. 11)	323 967	T	F：CATTCTACTGCTTCACTAAC R：GGTATCCTAATTGTTGATGG
52	NW_003377923.1 (Chr. 11)	476 412	C	F：CGACAGAGATAGGTATTCATC R：CAGGTTAGAGGTAAGTATAGTG
53	NW_003377884.1 (Chr. 11)	594 195	A	F：ACCCACGCACTTTCTCCTTT R：AATCAACCGAACCTGCCGAT
54	NW_003377884.1 (Chr. 11)	497 716	G	F：TTACACGACGCCATCTAC R：CATCTGTTGACGGATATAGC
55	NW_003377857.1 (Chr. 11)	112 321	A	F：GAAAGGGGAGGAGTGGCAAA R：CGCACGCGGTGTTAAGAAAT

2　结果

2.1　意大利蜜蜂染色体 DNA 非编码区 SNP 位点的初步验证

基于前期本团队重测序获得的 55 个与抗白垩病相关的意大利蜜蜂第 2 和 11 号染色体 DNA 非编码区 SNP 位点，我们通过 PCR 和测序方法，计算每个 SNP 在抗性个体和易感个体中等位基因频率，筛选到 2 个候选 SNP 位点等位基因频率在抗性个体与易感个体中存在差异显著性：C11378366T（所在染色体骨架为 NW_003378111.1）和 T14570310C（所在染色体骨架为 NW_003378155.1），分别位于第 2 号染色体的第 1 108 857 位和第 11 号染色体的第 156 247 位。分析测序峰图，发现这两个 SNP 均存在 3 种基因型：纯合 C/C，T/T 及杂合 C/T（图 1）。

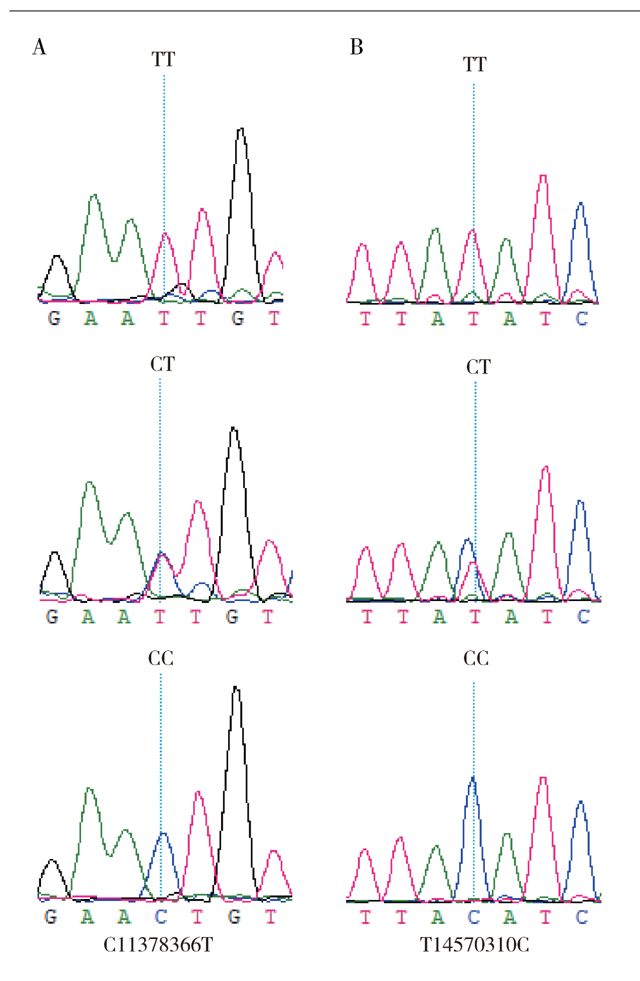


图 1 意大利蜜蜂染色体 DNA 非编码区与幼虫抗白垩病相关的 SNP 测序示意图

Fig. 1 Schematic diagram of sequencing SNPs associated with larva chalkbrood resistance in the non-coding region of DNA of chromosomes of *Apis mellifera mellifera*

A：位于第 2 号染色体的 SNP（C11378366T）（所在染色体骨架为 NW_003378111.1）的基因型 Genotype of the SNP C11378366T (scaffold: NW_003378111.1) on chromosome 2；B：位于第 11 号染色体的 SNP（T14570310C）（所在染色体骨架为 NW_003378155.1）的基因型 Genotype of the SNP T14570310C (scaffold: NW_003378155.1) on chromosome 11. 顶部 2 图为 TT 纯合个体的峰型图，中间 2 图为 CT 杂合个体的峰型图，底边 2 图为 CC 纯合个体的峰型图。The top two figures represent the peak pattern of TT homozygous individuals, the middle two figures represent the peak pattern of CT heterozygous individuals, and the bottom two figures represent the peak pattern of CC homozygous individuals.

SNP 位点 C11378366T 在抗病个体中 C 等位基因的频率显著高于 T 等位基因的频率，而在易感个体中 T 等位基因的频率高于 C 等位基因的频率；SNP 位点 T14570310C 在抗病个体和易感个体中的等位基因频率则与 SNP 位点 C11378366T 相反（图 2）。卡方分析表明：这两个 SNP 在易感病幼虫与抗病幼虫中均存在差异显著性（$P<0.01$）。为了进一步验证结果的可信度，我们将前期发现编码区与白垩病抗性相关的 SNP（C2587245T）在意大利蜜蜂 12 个抗病个体和 12 个易感个体中进行验证，发现在抗病个体中 C 等位基因的频率高于 T 等位基因的频率，这与我们前期的结果是一致的。

2.2 意大利蜜蜂染色体 DNA 非编码区 SNP 位点的扩大群体验证

为了进一步验证 SNP 的可靠性，意大利蜜蜂抗病样本与易感病样本各再取 90 头，用于再次验证 SNP 位点 C11378366T 和 SNP 位点 T14570310C。结果发现（图 3）：SNP 位点 T14570310C 中 T 等位基因在抗病个体中基因频率为 0.746269，而 T 等位基因在易感病个体中的基因频率为 0.564706，T 等位基因在抗病个体中的基因频率比在易感病个体中高，且抗病幼虫与易感病幼虫中的基因型分布仍然表现出显著性差异（$P<0.01$）；而 SNP 位点 C11378366T 在抗病幼虫与易感病幼虫中基因型分布没有显著性，因此，该 SNP 被淘汰掉。同时，我们发现 SNP 位点 C2587245T 中 C 等位基因频率在抗性个体较高，而 T 等位基因频率在易感个体较高，这与前期的结果也是一致的。

2.3 生物信息学分析

由 NCBI 数据库对 SNP 位点 T14570310C 进行定位查找，发现该 SNP 位于 *LOC*100578413 基因 5′端的非编码区 SNP。

3 讨论

本研究利用团队前期筛选出与白垩病相关的意大利蜜蜂染色体 DNA 非编码区 SNP，结合 Holloway 等（2013）QTL 结果中第 2 和 11 号染色体与蜜蜂幼虫抗白垩病显著相关，我们利用 PCR 测序的方法对第 2 和 11 号染色体 DNA 非编码区 55 个 SNP 进行验证，最终筛选出了一个位于第 11 号染色体上 *LOC*100578413 基因非编码区的 SNP 位点 T14570310C 与幼虫抗白垩病性状相关，该位点在抗病个体中的 T 等位基因基因频率更高。因此，SNP 位点 T14570310C 为 T/T 基因型的个体可以判定为抗性个体，而将 C/C 基因型的个体作为易感个体，该 SNP 判定个体抗病性或易感性的结果与前期编码区 SNP 位点 C2587245T 的结果是一致的。后期可以利用该 SNP 筛选基因型为 T/T 基因型的处女王，利用 CO_2 处理，可使其产生未受精卵，进而发育成 T 基因型的雄蜂，采集性成熟雄蜂的精液，通过

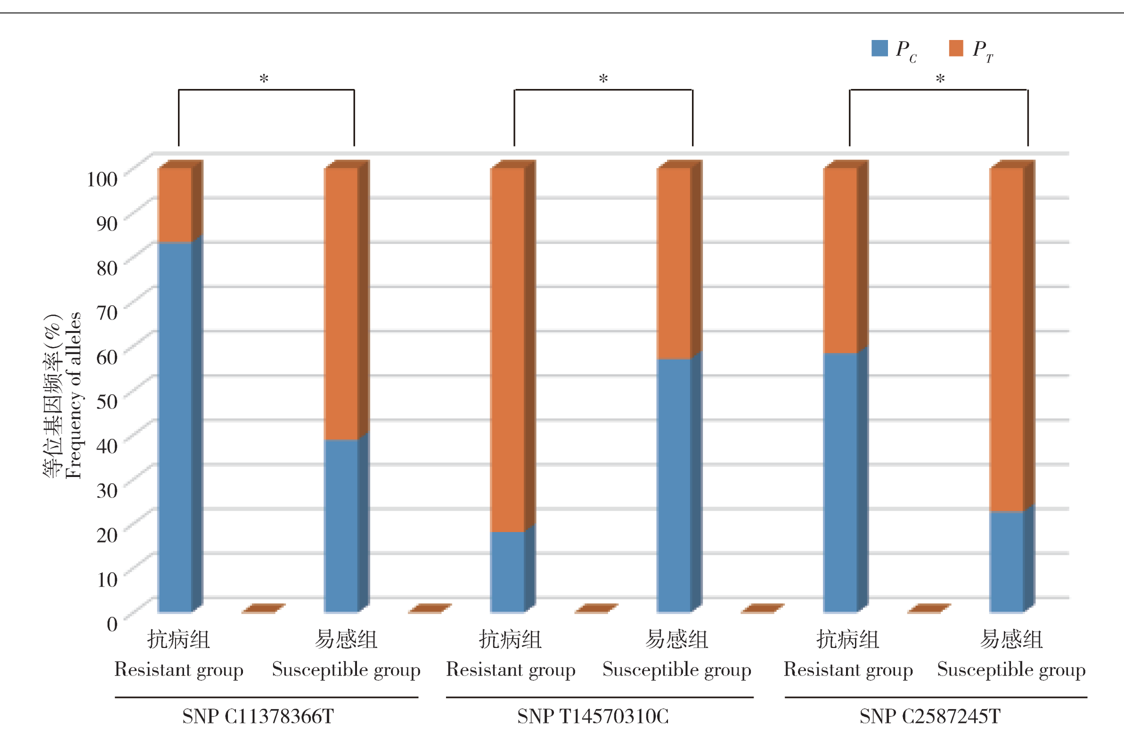


图 2　初步验证中意大利蜜蜂 SNP 的 C 和 T 等位基因频率

Fig. 2　Distributions of C and T allele frequencies of SNPs of *Apis mellifera ligustica* in preliminary verification

SNP C2587245T：编码区与白垩病抗性相关的 SNP (SNPs associated with chalkbrood resistance in coding regions)；P_C：SNP 位点处 C 等位基因频率 Frequency of C allele in the SNP loci；P_T：SNP 位点处 T 等位基因的频率 Frequency of T allele in the SNP loci. 图 3 同 The same for Fig. 3. 柱上星号示组间差异显著(卡方检验，$P<0.05$)。The asterisk above bars indicates significant difference between groups (*chi*-square test, $P<0.05$).

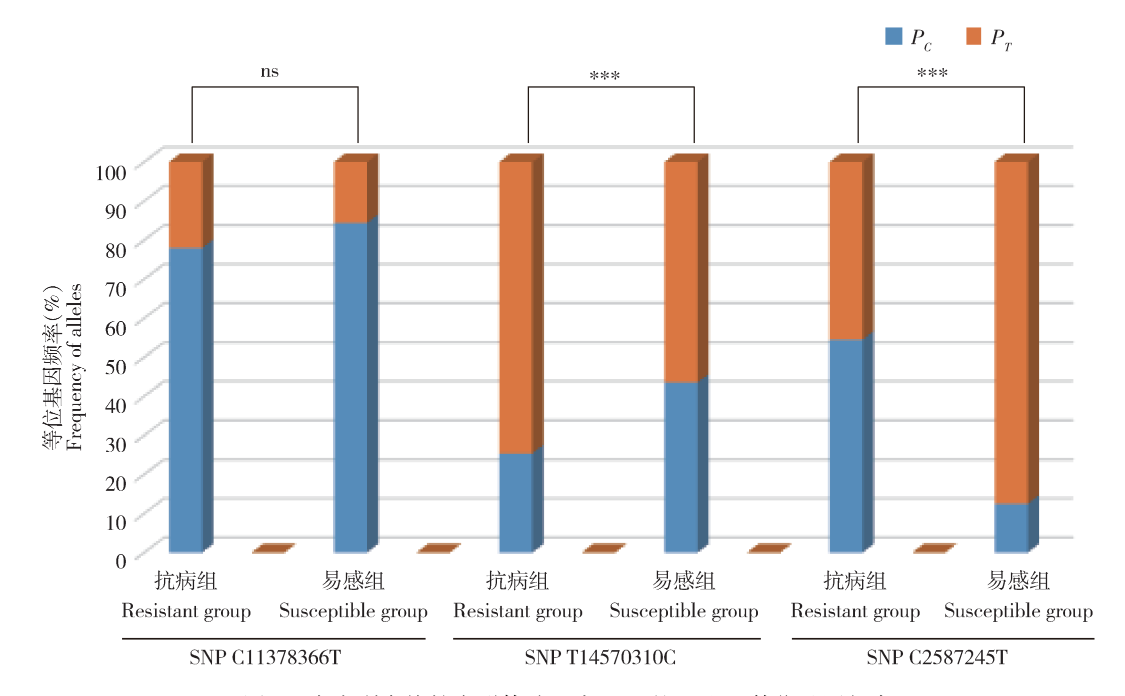


图 3　意大利蜜蜂扩大群体验证中 SNP 的 C 和 T 等位基因频率

Fig. 3　C and T allele frequencies of SNPs in the validation of expanded population of *Apis mellifera ligustica*

柱上 ns 和三星号分别表示组间无显著性差异($P>0.05$)和差异极显著($P<0.001$)(卡方检验)。ns and triple asterisk above bars indicate no significant difference ($P>0.05$) and extremely significant difference ($P<0.001$) between groups, respectively, by *chi*-square test.

人工授精的方式,进而可以培养大量抗白垩病蜂群。同时由于白垩病发病的初期没有明显症状,一旦出现明显症状,很快就会导致幼虫死亡,该分子标记为白垩病早期的诊断和培育白垩病抗性蜂种提供新的

检测方法。

关于 SNP 位点 T14570310C，它所在的基因 *LOC*100578413 在数据库中没有注释，属于未知功能基因的非编码区 SNP。非编码 DNA 是指不编码蛋白质的 DNA 序列，包括 ncRNA 和 miRNA 等，能够通过自身转录、DNA 甲基化、组蛋白修饰、重塑染色质等途径调控基因表达，影响多种生物学过程（秦丹和徐存拴，2013）。miRNA 与生物的生长发育、免疫、细胞凋亡、癌症等都存在重要的关系（Shomron *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013）。在黑腹果蝇中，miR-14 可作用于 *Drice* 和 *sugarbabe* 基因调控细胞凋亡及物质代谢（Xu *et al.*, 2003; Varghese *et al.*, 2010）；在家蚕中，miR-33，miR-190，miR-276 和 miR-7 可能调控蚕丝蛋白 L 链的转录（Burgler and Macdonald, 2005）；在蜜蜂中，发现采集蜂头部的 miR-2796 可能与蜜蜂的神经发育有关（Liu *et al.*, 2010）。同时非编码区 DNA 还会影响疾病，例如 NBN 基因 3′端非编码区 rs10464867 与胃癌风险相关（孙屏等，2019）；APC（结肠腺瘤性息肉病）基因 3′端非编码区 rs1804197 多态性与结直肠癌易感性相关（陈志鹏等，2017）；表皮生长因子 5′端非编码区 rs444490 位点多态性与肾母细胞瘤易感性及相关（周洲和朱房勇，2016）。基因非编码区的 SNP 要比编码区的 SNP 多，可以影响蛋白质的结构和功能，影响转录因子和顺式作用元件，如启动子、增强子、绝缘子、沉默子等的结合导致疾病的发生（Shomron *et al.*, 2009；戎晗等，2016）。如在人类医学方面的研究证实 beta-globin（HBB）基因增强子的缺失和重组可导致地中海贫血，Sonic hedgehog（SHH）基因 limb 增强子的点突变导致轴前多指症（Visel *et al.*, 2009）。此外，还有研究发现在人类染色体上一个长度为 136 kb 片段的着丝粒和端粒区域存在一些 SNP 位点与前列腺癌和结肠癌相关，部分位点位于高保守序列的增强子上（Alexander *et al.*, 2010）。尤其是一些位于基因非编码区的 SNP 还能通过影响 mRNA 的结构导致一些疾病的易感性，如丙型肝炎（Lu *et al.*, 2015）。研究表明，位于 miRNA 靶基因结合位点的一个或多个 SNP 位点与许多人类疾病在流行病学上显著相关。目前研究表明基因非编码区 SNP，如 miRNA 靶位点 SNP 与眼部疾病的易感性状有关（周洲和朱房勇，2016）。因此，SNP T14570310C 在白垩病抗性个体和易感个体之间存在显著差异，暗示该 SNP 可能通过某种途径导致蜜蜂幼虫对病原的抵抗能力产生影响。

目前，基因组编辑技术 CRISPER-Cas9 已在蜜蜂中应用，为基因功能验证提供了有力的技术保证。我们后期可以对 SNP T14570310C 位点进行编辑，深入研究该 SNP 在白垩病抗性机制中的作用。

参考文献（References）

Alexander RP, Fang G, Rozowsky J, Snyder M, Gerstein MB, 2010. Annotating non-coding regions of the genome. *Nat. Rev. Genet.*, 11(8): 559–571.

Anderson DL, Gibson NL, 1998. New species and isolates of spore-cyst fungi (Plectomycetes: Ascosphaerales) from Australia. *Aust. Syst. Bot.*, 11(1): 53–72.

Aronstein KA, Murray KD, 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*, 103(Suppl. 1): S20–S29.

Burgler C, Macdonald PM, 2005. Prediction and verification of microRNA targets by MovingTargets, a highly adaptable prediction method. *BMC Genomics*, 6: 88.

Chen D, Guo R, Xiong C, Zheng Y, Hou C, Fu Z, 2018. Morphological and molecular identification of chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis* in *Apis cerana cerana*. *J. Apicult. Res.*, 57(4): 516–521.

Chen ZP, Lu WD, Zuo Y, Zhu LJ, Song Y, Zhou F, Zhang YQ, 2017. Relationship between APC gene 3′-untranslated region rs1804197 polymorphism and colorectal cancer susceptibility. *Int. J. Oncol.*, 44(6): 433–437. [陈志鹏，卢玮冬，左云，朱陵君，宋宇，周芳，张永芹，2017. APC 基因 3′-非编码区 rs1804197 多态性与结直肠癌易感性的关系. 国际肿瘤学杂志，44(6): 433–437]

Crailsheim K, Brodschneider R, Aupinel P, Behrens D, Genersch E, Vollmann J, Riessberger-Gallé U, 2013. Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae. *J. Apicult. Res.*, 52(1): 1–16.

Flores JM, Gutiérrez I, Espejo R, 2005a. The role of pollen in chalkbrood disease in *Apis mellifera*: transmission and predisposing conditions. *Mycologia*, 97(6): 1171–1176.

Flores JM, Spivak M, Gutiérrez I, 2005b. Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood. *Vet. Microbiol.*, 108(1–2): 141–144.

Guo R, Chen D, Xiong C, Hou C, Zheng Y, Fu Z, Diao Q, Zhang L, Wang H, Hou Z, Li W, Kumar D, Liang Q, 2018. Identification of long non-coding RNAs in the chalkbrood disease pathogen *Ascospheara apis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 156: 1–5.

Heath LAF, 1982. Development of chalkbrood in a honeybee colony: a review. *Bee World*, 63(3): 119–130.

Holloway B, Tarver MR, Rinderer TE, 2013. Fine mapping identifies significantly associating markers for resistance to the honey bee brood fungal disease, chalkbrood. *J. Apicult. Res.*, 52(3): 134–140.

Invernizzi C, Rivas F, Bettucci L, 2011. Resistance to chalkbrood disease in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) colonies with different hygienic behaviour. *Neotrop. Entomol.*, 40(1): 28–34.

Jensen AB, Aronstein K, Flores JM, Vojvodic S, Palacio MA, Spivak M, 2013. Standard methods for fungal brood disease research. *J.*

Apicult. Res., 52(1): 1－20.

Li JH, Zheng ZY, Chen DF, Liang Q, 2012. Factors influencing *Ascosphaera apis* infection on honeybee larvae and observation on the infection process. *Acta Entomol. Sin.*, 55(7): 790－797. [李江红, 郑志阳, 陈大福, 梁勤, 2012. 影响蜜蜂球囊菌侵染蜜蜂幼虫的因素及侵染过程观察. 昆虫学报, 55(7): 790－797]

Li Z, You X, Wang L, Yan Z, Zhou Z, 2018. Spore morphology and ultrastructure of an *Ascosphaera apis* strain from the honeybees (*Apis mellifera*) in southwest China. *Mycologia*, 110(2): 325－338.

Liu S, Li D, Li Q, Zhao P, Xiang Z, Xia Q, 2010. MicroRNAs of *Bombyx mori* identified by Solexa sequencing. *BMC Genomics*, 11: 148－150.

Liu Y, Yan L, Li Z, Huang WF, Pokhrei S, Liu X, Su S, 2016. Larva-mediated chalkbrood resistance-associated single nucleotide polymorphism markers in the honey bee *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 25(3): 239－250.

Lu YF, Mauger DM, Goldstein DB, Urban TJ, Weeks KM, Bradrick SS, 2015. IFNL3 mRNA structure is remodeled by a functional non-coding polymorphism associated with hepatitis C virus clearance. *Sci. Rep.*, 5(1): 16037.

Maxfield-Taylor SA, Mujic AB, Rao S, 2015. First detection of the larval chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis* (Ascomycota: Eurotiomycetes: Ascosphaerales) in adult bumble bees. *PLoS ONE*, 10(4): e0124868.

Pöggeler S, 2001. Mating-type genes for classical strain improvements of ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56(5－6): 589－601.

Qin D, Xu CS, 2013. Characterization and identification of functional elements in non-coding DNA sequences. *Hereditas* (*Beijing*), 35(11): 1253－1264. [秦丹, 徐存拴, 2013. 非编码 DNA 序列的功能及其鉴定. 遗传, 35(11): 1253－1264]

Qin X, Evans JD, Aronstein KA, Murray KD, Weinstock GM, 2006. Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 715－718.

Reynaldi FJ, Lucia M, Genchi Garcia ML, 2015. *Ascosphaera apis*, the entomopathogenic fungus affecting larvae of native bees (*Xylocopa augusti*): first report in South America. *Rev. Iberoam. Micol.*, 32(4): 261－264.

Rong H, Gu SS, Zhang GW, Kang LH, Guan HJ, 2016. Recent advances in relationship between SNPs in non-coding regions and ocular diseases. *Rec. Adv. Ophthalmol.*, 36(4): 380－385. [戎晗, 顾珊珊, 张国伟, 康丽华, 管怀进, 2016. 非编码区单核苷酸多态性与眼部疾病关系的研究进展. 眼科新进展, 36(4): 380－385]

Shomron N, Golan D, Hornstein E, 2009. An evolutionary perspective of animal microRNAs and their targets. *J. Biomed. Biotech.*, 2009: 594738.

Spiltoir CF, 1955. Life cycle of *Ascosphaera apis* (*Pericystis apis*). *Am. J. Bot.*, 42(5): 501－508.

Sun P, Lyu H, Zhang RR, Chen XL, Wu LH, 2019. Biological functional analysis of rs10464867 in the 3′-untranslated region of NBN gene with gastric cancer. *Chin. J. Exp. Surg.*, 36(1): 127－130. [孙屏, 吕慧, 张熔熔, 陈许蕾, 吴靓骅, 2019. NBN 基因 3′端非编码区 rs10464867 遗传变异与胃癌易感性的生物信息学功能分析. 中华实验外科杂志, 36(1): 127－130]

Theantana T, Chantawannakul P, 2008. Protease and beta-N-acetylglucosaminidase of honey bee chalkbrood pathogen *Ascosphaera apis*. *J. Apicult. Res.*, 47(1): 68－76.

Varghese J, Lim SF, Cohen SM, 2010. *Drosophila* miR-14 regulates insulin production and metabolism through its target, *sugarbabe*. *Genes Dev.*, 24(24): 2748－2753.

Visel A, Rubin EM, Pennacchio LA, 2009. Genomic views of distant-acting enhancers. *Nature*, 461(7261): 199－205.

Vojvodic S, Jensen AB, James RR, Boomsma JJ, Eilenberg J, 2011. Temperature dependent virulence of obligate and facultative fungal pathogens of honeybee brood. *Vet. Microbiol.*, 149(1－2): 200－205.

Xu B, Wang Y, Zhu S, Zhou H, Gou C, Dong W, Wang Y, Gao Y, Ma H, 2019. Transcriptional profiling reveals the molecular bases of immune regulation in *Apis mellifera* in response to *Ascosphaera apis* infection. *Entomol. Res.*, 49: 26－34.

Xu PZ, Vernooy SY, Guo M, Hay BA, 2003. The *Drosophila* microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr. Biol.*, 13(9): 790－795.

Yan LM, 2014. Screening on Honeybee Genetic Markers Relating to Trait of Chalkbrood Resistance Using SNP Re-sequencing Technology. MSc Thesis, Zhejiang University, Hangzhou. [晏励民, 2014. 基于 SNP 重测序技术的蜜蜂抗白垩病性状相关的分子标记筛选. 杭州: 浙江大学硕士学位论文]

Zhang G, Hussain M, O′Neill SL, Asgari S, 2013. *Wolbachia* uses a host microRNA to regulate transcripts of a methyltransferase, contributing to dengue virus inhibition in *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(25): 10276－10281.

Zhao HX, Liang Q, Luo YX, Li JH, Zhang XF, Zeng XN, 2014. Chalkbrood disease in honey bees. *J. Environ. Entomol.*, 36(2): 233－239. [赵红霞, 梁勤, 罗岳雄, 李江红, 张学锋, 曾鑫年, 2014. 蜜蜂白垩病的研究进展. 环境昆虫学报, 36(2): 233－239]

Zheng ZY, Li JH, Liang Q, Chen DF, 2011. *Ascosphaera apis* secretes multiple extracellular enzymes to infect honeybee larvae. *J. Fujian Agric. For. Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 40(3): 280－284. [郑志阳, 李江红, 梁勤, 陈大福, 2011. 蜜蜂球囊菌分泌多种胞外酶侵染蜜蜂幼虫. 福建农林大学学报(自然科学版), 40(3): 280－284]

Zhou Z, Zhu FY, 2016. Association of rs4444903 polymorphism in the 5′ non-coding region of EGF gene and the susceptibility and prognosis of wilms tumor. *Int. J. Urol. Neph.*, 36(6): 822－824. [周洲, 朱房勇, 2016. 表皮生长因子 5′非编码区 rs4444903 单核苷酸多态性与儿童肾母细胞瘤易感性及预后因素的研究. 国际泌尿系统杂志, 36(6): 822－824]

(责任编辑: 马丽萍)